

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA

Programa de Iniciação Científica Voluntária - PICVOL

Caracterização molecular de papilomavirus humano em mulheres
HIV positivas no estado de Sergipe, Brasil.

Área de Concentração: Genética molecular e de Microorganismos

Bolsista: Edilaine Dória Araújo

Orientador(a): Prof. Dr. Marcus Vinicius de Aragão Batista
Departamento de Biologia

Relatório Final

Período
2016/2017

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica
PICVOL

RESUMO

O papilomavirus humano, HPV, é um vírus que ataca células da mucosa do hospedeiro. Por apresentar tropismo nessa região, o vírus atua como um epissomo, no qual insere sua maquinaria celular inibindo células imunossupressoras de tumor, provocando uma perturbação replicativa e levando ao desenvolvimento de lesões, resultado do produto da hiperplasia celular, como as cervicais. O vírus da imunodeficiência, HIV, é um vírus no qual ataca o sistema imune de defesa do organismo, especificamente as células TCD4. A coinfeção HIV-HPV tem demonstrado que, mulheres soropositivas apresentam maior prevalência da infecção por HPV, quando comparadas às mulheres HIV-negativas. Foram coletadas 146 amostras, da região endocervical de mulheres HIV-positivas, sendo essas do Estado de Sergipe, das quais 146 delas foram extraídas, 54 sequenciadas e tendo como resultado apenas três amostras negativas para o HPV; essa observação foi possível através da utilização da PCR com os primers de MY09/11 e GP 05+/06+. No Estado de Sergipe, não há registros de estudos que comprovem a circulação dos genótipos de HPV em mulheres HIV-positivas. Observamos que os achados moleculares estão de acordo com outras literaturas, no qual traz a análise da alta prevalência da infecção por HPV em mulheres soropositivas. Logo, faz-se necessário uma observação da frequência dos genótipos circulantes desse local. Este trabalho demonstrou que mulheres do Estado de Sergipe portadoras do vírus HIV estão apresentando prevalência da infecção pelo HPV, tornando-se um grave problema de saúde pública e servindo de suporte para novos trabalhos sobre a verdadeira eficácia da vacina que vem sendo implementada para o combate ao vírus HPV, de modo a levar a conhecimento aos profissionais e serviços voltados para prevenção e tratamento da saúde da mulher, a importância da não restrição de métodos invasivos, no combate ao desenvolvimento dessas lesões endocervicais.

PALAVRAS CHAVES: Papilomavirus humano, Virus da imunodeficiência, coinfeção HIV-HPV.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	04
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	07
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5. CONCLUSÃO.....	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) é uma doença sexualmente transmissível (DST) mais frequente no mundo (TROTHIER, H. *et al.*, 2006). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima cerca de 630 milhões de novos casos/ano em todo o mundo sendo 30 milhões associados aos condilomas acuminados, 30 milhões às lesões de baixo grau, 10 milhões às de alto grau e 500 mil ao câncer de colo do útero. O desenvolvimento destas lesões está diretamente relacionado com a presença de diferentes tipos de HPV (TROTHIER, H. *et al.*, 2006).

O câncer de colo uterino é a causa mais comum de morte por câncer em mulheres adultas em países em desenvolvimento e o segundo câncer mais comum em mulheres em todo o mundo (TROTHIER, H. *et al.*, 2006), com uma estimativa de meio milhão de novos casos e 274.000 mortes/ano segundo a OMS (WHO 2007). No Brasil, a estimativa para 2010 foi de cerca de 19.603 novos casos e 8.286 mortes em decorrência da doença (WHO 2010). A imunossupressão, principalmente adquirida, é a principal causa da manifestação da infecção por HPV. Atualmente a pandemia de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), em especial nos países subdesenvolvidos, aumentou a prevalência de infecção pelo HPV, o que torna ainda mais preocupante sua evolução para neoplasia de colo do útero. Em 1993, o câncer cervical invasivo foi adicionado à lista de doença definidoras do quadro de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) pelos *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos (CDC 1993).

O papel do HPV na gênese do câncer cervical é bem estabelecido biológica e epidemiologicamente (MUÑOZ *et al.*, 2006), porém a contribuição etiológica pelo HIV na gênese do câncer cervical permanece incerta (QUEIROZ, C. *et al.*, 2004). Estudos mostram que mulheres HIV-positivo tem uma maior prevalência de infecção pelo HPV (SANJOSÉ, S. *et al.*, 2002; MINKOFF, H. *et al.*, 1998), e frequentemente, estas mulheres estão infectadas com um maior número de tipos de vírus que as HIV-negativo (QUEIROZ, C. *et al.*, 2004; MINKOFF, H. *et al.*, 1998; PALEFSK, J., M. 2003). A presença de múltiplos tipos virais (TROTHIER, H. *et al.*, 2006) e de tipos virais de alto risco oncogênico (CASTELLSAGUÉ, X. 2008) está relacionada a desfechos desfavoráveis, tais como a persistência da infecção e aumento na prevalência e nas progressões das lesões. Além disso,

há uma maior evidência de lesões intraepiteliais cervicais entre as mulheres HIV-positivos quando comparadas às HIV-negativo (SANJOSÉ, S. *et al.*, 2002; PALEFSK, J., M. 2003; PALEFSK, J., M. 2006).

A prevalência do HPV, de modo geral, aumenta progressivamente com a diminuição das células CD4 (SANJOSÉ, S. *et al.*, 2002; PALEFSK, J., M. 2003; PALEFSK, J., M. 2006) e a presença de múltiplos tipos também pode aumentar com a diminuição de CD4. Além disso, a infecção por este vírus também se mostra mais persistente na população HIV-positivo (PALEFSK, J., M. 2003), o que pode contribuir para sua maior prevalência e para um risco maior de lesões intraepiteliais do colo uterino. Alguns fatores tem sido associados à progressão de tais lesões, como o uso prolongado de contraceptivos hormonais (por mais de 10 anos), multiparidade, tabagismo, coinfeção com outras DST (como o próprio HIV, herpes simples 2 e a *Chlamydia trachomatis*) e imunossupressão (TROTHIER, H. *et al.*, 2006; MUÑOZ *et al.*, 2006).

Não está claro, no entanto, se o HIV aumenta a suscetibilidade para uma infecção genital pelo HPV, independente dos padrões epidemiológicos de risco, ou se ele altera as associações entre os tipos específicos de HPV e a doença cervical que tem sido documentada na população em geral (SUN, X., W. *et al* 2005). É importante também lembrar os fatores relacionados com a coinfeção HPV-HIV, como tipos virais, variação no estado imunológico e presença de alterações citopatológicas, quando cruzados com diferentes populações, traduzem resultados conflitantes, o que reflete a importância das características regionais, étnicas, demográficas e desenho dos estudos (EDISON, N., F. *et al* 2011).

O HIV por si, já é um fator independente para o HPV, pois a infecção do papilomavirus humano com o hospedeiro parece ser mediada pela resposta imunológica do indivíduo, havendo lesões de maior gravidade e evolução mais rápida em pacientes com imunodeficiência (SANDRA, M., N., A., C. *et al.* 2015).

A relação do vírus da imunodeficiência humana HIV e o HPV começaram a ser investigada em 1988. O HPV e HIV apresentam uma via de transmissão em comum, a via sexual. As mulheres HIV-positivas são 5 vezes mais propensas à infecção pelo HPV. (SANDRA, M., N., A., C. *et al.* 2015)

A coinfeção HIV e HPV é um fenômeno completamente previsível, tendo em vista que os fatores de risco para essas duas infecções são bastante similares como

múltiplos parceiros sexuais, idade precoce para primeira relação sexual, sexo com homens que tiveram múltiplas parceiras, baixo nível socioeconômico e prática sexual sem proteção são importantes fatores ou risco comuns às duas infecções virais (SANDRA, M., N., A., C. *et al.* 2015).

A associação entre o câncer cervical e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) é bem estabelecida na literatura. A prevalência de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) tem se mostrado mais alta entre mulheres infectadas pelo HIV (20 a 60%) quando comparadas às mulheres não infectadas. A associação entre câncer cervical e papilomavírus humano (HPV) está confirmada por inúmeros estudos, mas a contribuição da infecção pelo HIV na gênese e evolução do tumor cervical está em estudo. Dados atuais sugerem que a exposição à infecção pelo HIV pode aumentar a incidência da persistência pelo HPV e das lesões intraepiteliais escamosas cervicais, provavelmente pela fraca resposta do sistema imune (ZIMMERMMANN, *et al* 2006).

Os métodos de diagnóstico para infecção por HPV baseados na reação em cadeia em polimerase (PCR) têm a maior sensibilidade de detecção dos genomas virais, quando comparados com outras metodologias, o que tem permitido a investigação sistemática de infecções múltiplas. A PCR vem sendo considerada a técnica com maior sensibilidade, especificidade e velocidade de análise, podendo assim, ser considerado método molecular de escolha para o eficiente diagnóstico do HPV (CARMO, E., F., S. 2007). Mesmo com alguns trabalhos apresentando um forte indicativo que, na presença do HIV há uma maior prevalência de infecção pelo HPV, os estudos no nosso país ainda são bastante escassos quanto à gênese e evolução das lesões cervicais em mulheres HIV-positivas. Logo, nosso trabalho tem como principal objetivo, rastrear os HPVs circulantes aqui da região em mulheres HIV-positivas do Estado de Sergipe, servindo de suporte científico para posteriores trabalhos e busca de melhorias nos serviços públicos que possam reavaliar as práticas dos serviços de Saúde Pública, voltadas à Saúde da Mulher, com a finalidade de dar uma maior atenção a essas pacientes que já demonstram uma deficiência imunológica, buscando métodos mais eficazes de tratamento das mesmas, como também observar a verdadeira eficácia da vacina já implementada contra esses genótipos, os papilomavirus humano (HPV), que levam ao aparecimento de lesões cervicais (CHRISTIANE, M., C. 2009).

2. REVISÃO DA LITERATURA

O Papilomavírus humano (HPV) pertence à família Papillomaviridae, subfamília Papillomavirinae e ao gênero Papilomavírus os quais são caracterizados por vírus pequenos, não-envelopados, de DNA dupla-hélice, que se replicam no núcleo de células epiteliais escamosas. O genoma do HPV contém aproximadamente 8 ORFs (Open Reading Frame = quadro aberto de leitura) classificados em precoce (E) e tardio (L), no total de aproximadamente 8,000 pares de base (FAVRE,1975; BURD, 2003). A região E codifica proteínas reguladoras virais, incluindo aquelas necessárias para a iniciação da replicação do DNA viral. Os ORF L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo que são expressas somente em células produtivamente infectadas (SAPP, *et al.*,1995). A posição, o tamanho e a função de muitos dos ORF são altamente conservados dentre os papilomavírus (GONZÁLEZ, 2007).

As proteínas E1 e E2 são necessárias para a replicação viral do DNA e formam um complexo em torno da origem de replicação. A proteína E2 funciona como um repressor do promotor viral precoce, controlando o mecanismo de replicação (STANLEY, 2008). O gene E3 está presente em poucos tipos de HPV, mas parece não ter função conhecida. A proteína E4 parece estar envolvida em alterações da rede de citoesqueleto. A proteína E5 possui atividade transformante por agir em sinergismo com receptores de fator de crescimento. As proteínas E6 e E7 dos HPV de alto-risco são as principais responsáveis pela transformação das células epiteliais cervicais e atuam na modulação de atividades de proteínas celulares que regulam o ciclo celular (SYRJÄNEN, *et al.*,1999). As regiões tardias L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo viral sendo altamente conservadas dentre os papilomavirus e por consistirem em antígenos de superfície são utilizados como alvos para vacinas (MARKOWITZ, *et al.*,2007). Foi demonstrada a importância das proteínas L1 e L2 na ligação a receptores celulares durante os primeiros estágios de infecção celular pelo HPV (HORVATH, *et al.*,2010). Variações nas seqüências da região L1 definem a classificação do tipo viral (KANESHIMA *et al* 2003). A região LCR (Long Control Region = região controladora longa) contém elementos reguladores da transcrição e replicação viral (ZUR HAUSEN,1996).

O HPV é uma das causas mais comuns de doenças sexualmente transmissíveis em mulheres e homens no mundo (ZUR HAUSEN,1996). O risco de contrair infecção por HPV é influenciado pela atividade sexual (WALBOOMERS, *et al.*,1999).

Existem mais de 170 tipos de HPV, alguns tipos chamados de baixo grau (tipos 6, 11, 30, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 84, 85, 86) estão relacionados à etiologia de lesões benignas como papilomas, verrugas comuns e condilomas. Os HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, e 82 são vírus de alto risco e são considerados agentes causais de no mínimo 90% dos cânceres de cérvix e também estão relacionados a mais de 50% de outros cânceres anogenitais (ZUR HAUSEN,1996; DE VILLIERS, 2004; BOUVARD, *et al.*, 2009). O HPV 16 é considerado o tipo de alto risco mais comum, encontrado em no mínimo 50% de todos os casos de câncer cervical (BOSH, *et al.*,2008). Há ainda tipos virais cuja classificação de risco não está bem estabelecida, como o HPV 70 que ora é classificado como baixo risco 23 (MUNOZ, *et al.*, 2003) ou, devido a semelhança filogenética ao HPV18, é considerado de alto risco (DE VILLIERS, 2004).

Existem subtipos de HPV de baixo risco (associados com condilomas na forma de lesões intraepiteliais (LIE)) e outros de alto risco (associados com cânceres de colo de útero) de carcinogênese. Dentre os primeiros, incluem-se os subtipos 6, 11, 42, 43 e 44; dentre os que são de alto risco, incluem-se 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 46, 51, 52, 56, 58, 59, 68 e 70 (MELO, D., E., *et al*, 2012).

A partir da contaminação, o HPV é capaz de estabelecer infecção transitória ou persistente. Na infecção transitória, que ocorre em torno de 80% a 90% das infecções por HPV, o DNA viral torna-se indetectável dentro de 1 a 2 anos após a infecção. A persistência da infecção, determinada pela presença do genoma viral na lesão, está associada aos HPV de alto risco. A persistência de infecção cervical pelos tipos HPV 16/18 por mais de 6 meses mostrou-se associada em 65% das mulheres investigada com desenvolvimento de lesões de alto grau (NIC II/III) (HO, *et al.*,1998; STANLEY, 2008; TROTTIER, *et al.*,2009).

As lesões por HPV ocorrem em qualquer área da cérvix. Quando ocorre progressão de lesão de baixo grau (infecção por HPV e lesão intraepitelial de baixo grau - LIEBG) para alto grau (lesão intraepitelial de alto grau – LIAG e carcinoma in situ) também ocorre alteração na relação vírus-hospedeiro; e o vírus que nas lesões benignas estava presente na forma episomal e em múltiplas cópias, nas lesões malignas ele passa a forma

linear e se integra ao genoma da célula epitelial (BAKER, *et al.*, 1987; ARENDS, *et al.*, 1998; THORLAND, *et al.*, 2000; KALANTARI, *et al.*, 2001 ; HUDELIST, *et al.*, 2004; WENTZENSEN, *et al.*, 2004). O sítio de integração do HPV nos cromossomos é aleatório, porém constante em todas as células de um mesmo tumor e parecem ter alguma preferência por alguns sítios no genoma, como aqueles próximos a sequencias codificadoras de oncogenes celulares (WENTZENSEN, *et al.*, 2004; ROSTY *et al.*, 2006; COUTURIER, *et al.*, 1991; THORLAND, *et al.*, 2000).

Mulheres com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) são assintomáticas. A suspeita diagnóstica é feita através da detecção de células anormais no esfregaço cervical e confirmada na biópsia dirigida pela colposcopia. A divisão da NIC em baixo e alto grau é compatível com a hipótese de que o HPV pode agir como agente infeccioso (NIC de baixo grau) ou neoplásico (NIC de alto grau), produzindo lesões patológicas distintas (MOSCICKI, *et al.*, 2006; PAAVONEN, 2007).

A NIC de baixo grau causada pela infecção por HPV geralmente é temporária e desaparece com o tempo, embora alguns casos (16%) progridam para NIC de alto grau (SPITZER, *et al.*, 1998). As mulheres com NIC de alto grau têm maior risco de desenvolver câncer invasivo, isto geralmente ocorre lentamente no decorrer de muitos anos (HOLOWATY, *et al.*, 1999).

O câncer de colo de útero é caracterizado pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, comprometendo o tecido subjacente (estroma) e podendo invadir estruturas ou podendo invadir estruturas e órgãos contíguos ou a distância. Há duas principais categorias de carcinomas invasores do colo do útero, dependendo da origem do epitélio comprometido: o carcinoma epidermoide, tipo mais incidente e que acomete o epitélio escamoso (representa cerca de 80% dos casos), e o adenocarcinoma, tipo mais raro e que acomete o epitélio glandular. (BRASIL, 2010).

Com aproximadamente 530 mil casos novos por ano no mundo, o câncer do colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pelo óbito de 274 mil mulheres por ano (WHO, 2008).

As taxas de incidência estimada e de mortalidade no Brasil apresentam valores intermediários em relação aos países em desenvolvimento, porém são elevadas quando comparadas às de países desenvolvidos com programas de detecção precoces bem estruturados. Países europeus, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália apresentam as

menores taxas, enquanto países da América Latina e, sobretudo, de regiões pobres da África, apresentam valores bastante elevados. Segundo Globocan (WHO, 2008), enquanto na Finlândia as taxas de incidência e de mortalidade por câncer do colo do útero, padronizadas pela população mundial, foram 3,7 e 0,9 por 100 mil mulheres, respectivamente, na Tanzânia alcançaram valores de 50,9 e 37,5. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 80% dos casos de câncer do colo do útero ocorreram nos países em desenvolvimento (WHO, 2008), que concentram 82% da população mundial (UM, 2008).

Na análise regional no Brasil, o câncer do colo do útero destaca-se como o primeiro mais incidente na Região Norte, com 24 casos por 100 mil mulheres. Nas Regiões Centro-Oeste e Nordeste ocupa a segunda posição, com taxas de 28/100 mil e 18/100 mil, respectivamente, é o terceiro mais incidente na Região Sudeste (15/100 mil) e o quarto mais incidente na Região Sul (14/100 mil) (BRASIL, 2011).

Quanto à mortalidade, é também a Região Norte que apresenta os maiores valores do País, com taxa padronizada por idade, pela população mundial, de 10,1 mortes por 100 mil mulheres, em 2009. Em seguida estão, nesse mesmo ano, as Regiões Nordeste e Centro-Oeste (5,9/100 mil mulheres), Sul (4,2/100 mil mulheres) e Sudeste (3,6/100 mil mulheres) (BRASIL, 2012).

Essa doença se inicia a partir de uma lesão pré-invasiva curável em até 100% dos casos que, normalmente, progride de forma lenta por 10 a 20 anos até atingir o estágio invasor, etapa em que a cura se torna mais difícil, quando não impossível (MULLER, D., K., *et al*, 2008).

O Papiloma Vírus Humano (HPV) cuja transmissão ocorre preferencialmente, pelo contato sexual (LEPIQUE, A., P.; RABACHINI, T.; VILLA, L., L., 2009), está presente em quase 100% dos casos de câncer do colo de útero, porém, para o desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões pré-invasivas, é necessária a sua associação com outros fatores de risco, que são o tabagismo, multiplicidade de parceiros sexuais, uso de contraceptivos orais, multiparidade, baixa ingestão de vitaminas, iniciação sexual precoce e coinfeção por agentes infecciosos, como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (NADAL, L., R., M.; NADAL, NADAL, S., R., 2008; TUCUNDUVA, *et al*. 2004).

O vírus do HPV possui um genoma de DNA de cadeia dupla combinado com histonas, que formam um complexo semelhante a um cromossoma, contido num capsídeo

externo de proteína virótica (CROSSART, Y., E., *et al*, 1990; GIL, A., O., 1998). Tal capsídeo é formado por 72 subunidades (capsômeros), com arranjo icosaédrico, sendo, por esse motivo, de aparência esférica à microscopia eletrônica. É constituído por dois tipos de proteína estrutural: L1 (proteína maior), que é gênero específica, correlacionada à presença de HPV intacto nos tecidos e, por isso, serve como medidor indireto de infectividade e L2 (proteína menor) que é altamente tipo-específica (GIL, A., O., 1998; BROWN, D., R., *et al*. 1993).

O HPV explora a maquinaria celular do hospedeiro para se replicar. O ciclo se inicia quando as partículas virais alcançam a camada basal do epitélio, onde podem infectar as células tronco, que são altamente proliferativas. Quando essas células são empurradas para a camada suprabasal, elas perdem a capacidade de se dividir e começam a se diferenciar. O HPV é liberado para o meio ambiente por meio da desintegração das células epiteliais nas camadas superficiais (MUÑOZ, *et al.*, 2006)

Em nosso país, a abordagem mais efetiva para o controle deste câncer continua sendo a detecção precoce por rastreamento pelo exame do Papanicolau (LUCIANI, S.; ANDRUS, J., K., 2008), que é simples, de baixo custo e oferecido e oferecido por toda a rede pública de saúde.

No entanto, os sinais e sintomas do câncer do colo de útero aparecem tardiamente, o que leva muitas mulheres a procurar o médico somente quando a doença está em estágio avançado, diminuindo as chances de um tratamento menos invasivo, e consequentemente, de cura, pois o prognóstico piora com o avanço da doença (OTTO, S., E., 2002).

Segundo a UNAIDS, a AIDS pode hoje, ser considerada como a maior pandemia do século XX com cerca de 34,0 milhões de pessoas infectadas no mundo e cerca de 2,5 milhões de casos novos ao ano. A grande maioria dos infectados vive em países do Terceiro Mundo, notadamente na África Sub-Sahariana, onde estão mais de 69% das pessoas vivendo com AIDS no mundo. As mulheres continuam sendo mais afetadas que os homens (58% dos adultos infectados por HIV na África Sub-Sahariana são mulheres) (UNAIDS/WHO, 2012).

Pacientes HIV-positivos têm maior frequência de infecções por HPV. Em seu estudo realizado em Camarões, África, Desruisseau e colaboradores (2009) encontraram prevalência de 81,3% de infecção por HPV em pacientes HIV-positivos em contraste com pacientes HIV-negativos que tiveram prevalência de 51,7%.

Nas mulheres infectadas pelo HIV há uma maior prevalência de tipos de HPV de alto risco oncogênico comparadas com mulheres HIV negativas (FAKHRY, *et al*, 2006; SAHASRABUDDHE, *et al.*, 2010). Existe uma controvérsia em relação a distribuição de tipos de alto risco em mulheres HIV-positivas. Alguns autores mostraram uma maior frequência de HPV 16 e 18 nas amostras cervicais (NG`ANDWE, *et al.*, 2007; DE VUYST *et al.*, 2008), enquanto que esse fato não foi verificado por 28 outros autores onde a frequência desses tipos de HPV foram inferiores a outros tipos como os tipos 58, 53, 31 e 33 (LUQUE, *et al.*,2006; MACLEOD, *et al.*,2011; RAHMAN, *et al.*,2011; GARBUGLIA, *et al.*,2012).

Alguns autores têm afirmado que mulheres infectadas por HIV têm maior prevalência de HPV, de múltiplos tipos de HPV e prevalência mais elevada de subtipos oncogênicos que mulheres não infectadas pelo HIV. (CHATURVEDI, A.,K. *et al* 2005).

Em um estudo caso-controle realizado no Recife, a frequência de infecção por HPV foi de 74,5% de mulheres não-grávidas HIV-positivas, 80% em mulheres grávidas HIV-negativas e 96% mulheres grávidas HIV-positivas. Dentre as mulheres grávidas co-infectadas HIV/HPV, 60,4% dos tipos de HPV eram de alto risco. Os tipos HPV 16, 58, 18, 66 e 31 foram os mais frequentes (BRANDÃO, *et al.*, 2009).

Na Tanzânia, as mulheres HIV-positivas tiveram cerca de três vezes mais risco de desenvolver câncer cervical (OR=2,9; IC95%=1,4–5,9), sugerindo que o risco esteja associado com o aumento da persistência do HPV devido à imunossupressão relacionada à infecção pelo HIV (KAHESA, *et al.*,2008).

Minkoff e colaboradores (2001) demonstraram a associação entre regressão e progressão da lesão cervical em pacientes infectados por tipos HPV oncogênicos e uso da terapia antirretroviral de alta potência (TARV). Nesse estudo, nas mulheres fazendo uso de TARV a regressão da lesão foi 1,4 vezes maior do que os pacientes sem uso de TARV (OR=1,4; IC95%=1,04-1,82). Em relação à progressão da lesão, os pacientes sem uso de TARV tiveram risco 1,5 vezes maior de progressão comparado aos pacientes em uso de TARV (OR=1,5; IC95%=1,3-1,9)

Em outro estudo realizado na França com 121 mulheres soropositivas para o HIV, tratadas previamente por apresentarem algum grau de neoplasia cervical, verificou-se que a TARV tem efeito protetor para recorrência de neoplasia cervical (RR=0,3; IC95%=0,1-0,7),

inclusive para as lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (RR=0,2; IC95%=0,1-0,7) (DELMAS, *et al.*,2000).

No entanto, há controvérsias em relação ao efeito da TARV na história natural da NIC em mulheres infectadas com HIV. Sahasrabuddhe e colaboradores (2010) relataram que a TARV foi um fator preditor independente para o aumento da gravidade das NIC (OR= 2,24; IC 95%=1,17-4,26, $p<0,01$) em mulheres Indianas, onde a mediana da contagem de linfócitos T CD4+ foi de 343/ μ l. Os autores sugeriram que as mulheres fazendo uso de TARV vivem mais do que as que não usam TARV, e o estado de moderada imunossupressão contribuiria como risco para a lenta progressão das neoplasias cervicais associadas a infecções persistentes de HPV de alto risco.

A contagem de linfócitos T CD4+ menor que 200/mm³ e alta carga viral são fatores de risco adicionais para a progressão da doença. Assim, à medida que a contagem dos linfócitos T CD4+ diminui e a carga viral aumenta, há maior prevalência das infecções HPV latentes e clinicamente expressas, bem como possível progressão das lesões (MEYS, *et al.*, 2010).

A prevalência da infecção pelo HPV aumenta à medida que ocorre a progressão do dano imunológico associado à infecção pelo HIV, ou seja, a persistência da infecção pelo HPV é inversamente proporcional à contagem de linfócitos T CD4+, e diretamente proporcional à carga viral plasmática do HIV.(ARAÚJO, A., C., L. *et al* 2005).

Campos *et al.* em 2005, estudando mulheres infectadas pelo HIV, encontraram 73,2% de resultados positivos para o DNA HPV nesse grupo, comparado a 23,8% entre as soronegativas. Houve tendência à infecção por múltiplos tipos de HPV nas portadoras de HIV, enquanto que a infecção simples predominou nas soronegativas.

3. METODOLOGIA

As amostras foram coletadas de pacientes do sexo feminino, um total de 146 amostras, com diagnóstico definitivo para o HIV, oriundas de diversas regiões do Estado de Sergipe. Elas são acompanhadas no Centro de Especialidades Médicas de Aracaju (CEMAR), local de referência para tratamento de pacientes HIV-positivos. As mesmas se submeteram a participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido (TCLE). No estudo, foram incluídas as pacientes que são acompanhadas rotineiramente no serviço e as amostras foram obtidas por profissionais habilitados para a realização do exame citopatológico. No momento do exame, eram coletados da região endocervical, material mucoso com o auxílio da utilização de escova ginecológica e imersa em solução tampão com PH 7,4. As pacientes em estudo responderam a questionários contendo variáveis como: idade, estado atual do relacionamento, idade do primeiro exame preventivo, idade da primeira relação sexual, número de abortos, número de partos, histórico de DST, entre outros. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob número de protocolo CAAE: 23374014100005545.

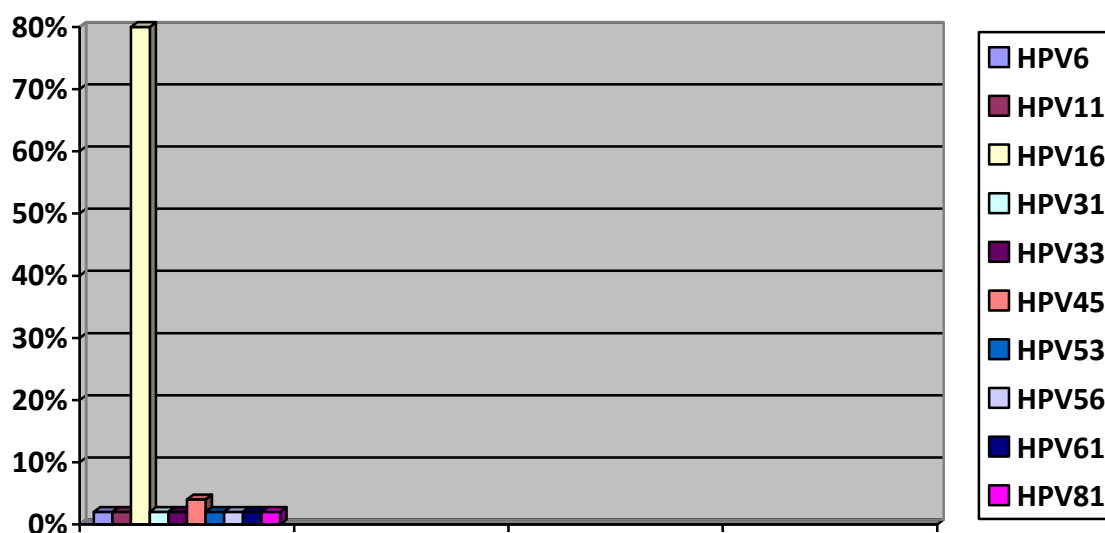
As amostras coletadas foram imersas em solução PBS (7,4) e mantidas em freezer a -20°C. O DNA está sendo extraído com kits de extração da Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. No total, foram extraídas 72 amostras. O DNA viral foi amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os iniciadores degenerados MY09/11 (MANOS et al, 1989) os quais amplificam fragmentos de DNA em torno de 450 pb do gene L1. Toda reação está sendo preparada para volume final de 20 uL com a utilização do kit PCR Master Mix (Promega), seguindo instruções do fornecedor. Os ciclos da PCR, para o marcador de MY foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto; 50°C por 1 minuto para o anelamento; 72°C por 1 minuto para extensão, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos. Em seguida, utilizou-se os iniciadores degenerados de GP com uma fase de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, uma fase de desnaturação final, 44 ciclos de desnaturação, 95°C por 45 segundos, uma fase de anelamento de 47,7°C por 45 segundos seguida de uma extensão inicial de 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. A PCR utilizando o primer de GP (DE RODA HUSMAN, A., M. 1995) foi realizada retirando 2 uL do produto da PCR de MY. No final, um total de 10 microlitros de produto da PCR foi submetido ao processo de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os géis foram submetidos à fotografia para identificação dos produtos amplificados em fotodocumentador.

A genotipagem dos HPVs foi realizada a partir do sequenciamento da região genômica amplificada através de Sequenciador Automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para a realização do sequenciamento, os produtos da PCR foram

purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). O sequenciamento foi realizado utilizando o kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v.3.1 (Applied Biosystems).

A qualidade do sequenciamento e a montagem dos contigs foram realizadas com o auxílio dos programas Pregap4 e Gap4, que fazem parte do pacote Staden. Apenas sequências com valor de Phred acima de 30 foram utilizadas. Alinhamentos locais foram realizados com a ferramenta BLAST, com o objetivo de determinar a identidade entre as sequências obtidas e as sequências dos tipos virais já descritos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO



1. Gráfico representando a frequência de genótipos de HPV em amostras de mulheres HIV-positivas do Estado de Sergipe. Total de 51 amostras positivas.

De um total de 146 amostras coletadas, foram extraídas 146 delas, das quais apenas 54 foram submetidas a sequenciamento. Destas, três foram negativas para o HPV, estando assim em consonância com outros estudos no país e no mundo, sobre a alta prevalência da coinfeção HPV-HIV.

Os genótipos circulantes encontrados aqui no Estado foram os tipos: HPV 16 (80%), HPV 45 (4%), HPV 53 (2%), HPV 56 (2%), HPV 61 (2%), HPV 31 (2%), HPV 11

(2%), HPV 81 (2%) e HPV 31 (2%) e HPV 33 (2%). Um total de 10 tipos diferentes circulantes, corroborando com outros estudos que confirmam a prevalência de infecção por múltiplos genótipos em mulheres HIV-positivas.

O HPV 16 foi mais representativo nessa amostragem, 80%, corroborando com dados de outros estudos que vem demonstrando sua prevalência em achados citológicos e discordando da literatura, a qual traz o tipo 18 como o segundo mais frequente. Até o presente estudo, não foi observado esse tipo viral em nenhuma das amostras. Estudos realizados com relação à prevalência de HPV em lesões cervicais no Brasil mostram que o HPV-16 é o tipo predominante. (CERQUEIRA, et al., 2008). O HPV 16 é considerado o tipo de alto risco mais comum, encontrado em no mínimo 50% de todos os casos de câncer cervical (BOSCH, *et al.*, 2008).

. Alguns autores sugerem um acompanhamento de saúde diferenciado às mulheres com HIV, sugerindo-se dois exames citológicos no primeiro ano após o diagnóstico da infecção pelo HIV e depois anualmente, independente da idade. Nos casos de baixo risco, podem ter intervalos de seguimentos mais longos, estendendo-se a cada dois ou três anos, em vez de anualmente (ADELER *et al.*, 2014; DAMES *et al.*, 2014; HEARD *et al.*, 2013; ISAAKIDIS *et al.*, 2013., LOFGREN *et al.*, 2015).

Associado ao exame citológico sugere-se o uso da colposcopia e biópsia como um protocolo seguro de acompanhamento para mulheres com HIV, em especial em locais onde não há recursos disponíveis para métodos biomoleculares de diagnóstico (OLIVEIRA *et al.*, 2010.; ARAÚJO *et al.*, 2012.; LEIBENSON *et al.*, 2011.; ISAAKIDIS *et al.*, 2013).

Dentre às demais abordagens de estudo, destaca-se a importância da vacinação contra o HPV em todas as mulheres com HIV por considerá-la uma importante ferramenta de prevenção (LEIBENSON *et al.*, 2011). No entanto, apesar disso, a vacina ainda necessita do desenvolvimento contínuo, uma vez que os estudos apontam a prevalência de infecção por HPV de alto risco que não são contemplados pela vacina atualmente disponível. (BRASIL, 2016.; ADLER *et al.*, 2014., CASTILHO *et al.*, 2015). Apesar das práticas de políticas públicas estarem voltadas para a importância do combate pela infecção provocada pelo HPV, através dos achados citológicos e histológicos dos exames ginecológicos, ainda faz-se necessário reavaliar a verdadeira eficácia da vacina.

Deve-se ainda considerar a infecção por mais de um tipo de HPV de alto risco, por estar fortemente associada com a citologia cervical anormal, destacando a necessidade de

vacinas contra o HPV multivalentes, especialmente em países com recursos limitados para outras formas de rastreio, como a genotipagem e os exames citológicos (NDIAYE *et al.*, 2012.; ADLER *et al.*, 2014., CASTILHO *et al.*, 2015).

Atualmente, há duas vacinas, para o HPV, aprovadas e comercialmente disponíveis no Brasil: a bivalente, que protege contra os tipos oncogênicos 16 e 18, e a quadrivalente, que protege contra os tipos não oncogênicos 6 e 11 e os tipos oncogênicos 16 e 18. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Este trabalho demonstrou que, apesar de possuir cobertura imunológica para os tipos não oncogênicos 6 e 11, e os oncogênicos 16 e 18, encontramos aqui no Estado de Sergipe, achados para três destes tipos contidos na vacina. Logo, os dados corroboram com outros estudos, o que leva a conhecimento sobre a importância das práticas de prevenção do desenvolvimento do câncer do colo de útero não se restringirem aos exames citológicos e histológicos.

Vale ressaltar que as envolvidas no estudo não apresentavam diagnóstico definitivo para lesões cervicais, tornando-se, mais uma vez, base para novos estudos que possam demonstrar que na presença do HIV há prevalência da infecção por HPV.

O presente trabalho utilizou de exames de alta qualidade com tecnologias bastante sensíveis para detecção do DNA de um amplo espectro de tipos de HPV, no intuito de elucidar a epidemiologia da infecção por HPV em mulheres portadoras do HIV. Acredita-se que a partir dos dados obtidos nessa pesquisa possam surgir novas estratégias de prevenção do câncer do colo do útero, CCU nessa população, permitindo, assim, a ampliação e promoção da saúde, seja na vigência da doença ou na detecção precoce dos tipos de HPV.

Como limitação de estudo, teve-se o fato do tamanho da amostragem sequenciada, até o momento, ser relativamente pequena, o que pode ter prejudicado, parcialmente nossos resultados, uma vez que, a maioria dos dados disponíveis sobre a coinfeção HIV/HPV e a genotipagem do HPV resultam de grandes estudos multicêntricos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem inferir que mulheres com HIV são vulneráveis a alterações citológicas. Ele, demonstrou que mulheres portadoras do HIV, estão sendo infectadas por diversos genótipos de HPV, incluindo os de alto poder oncogênico, aqui no Estado de Sergipe.

Em função dos achados de genótipos, constata-se a necessidade de incentivar constantemente as mulheres com HIV às práticas de autocuidado, em especial o exame de prevenção ginecológica, buscando identificar precocemente qualquer alteração citológica e assim evitar precocemente o desenvolvimento do câncer do colo do útero.

Por fim, estudos desta natureza, através dos métodos moleculares e do perfil social, clínico e epidemiológico das mulheres com HIV podem influenciar na tomada de decisão da prática clínica e na promoção da saúde através da elaboração de protocolos específicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

THOTTIER, H.; FRANCO, E. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**. 2006;24:4-15.

World Health Organization [Internet]. WHO; c2007-2010 [atualizada em 2007]. Cervical cancer, human papillomavirus (HPV), and HPV vaccines - Key points for policy-makers and health professionals; Disponível em: http://www.rho.org/files/WHO_PATH_UNFPA_cxca_key_points.pdf. (acesso em: 2010 Mai 24).

World Health Organization. [Internet]. WHO; c2010 [atualizada em 2010 Fev 19]. Human papillomavirus and cervical cancer: Summary report; Disponível em: http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/XWX.pdf?CFID=3841794&CFTOKEN=51049719 (acesso em: 2010 Mai 24).

CDC. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR**. 1993;41:1-20.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZÁLEZ, A., B.; GISSMAN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**. 2006;24(3):1-10.

SANJOSÉ, S.; PALEFSKY, J. Cervical and anal HPV infections in HIV positive women and men. **Virus research**. 2002;89:201-1.

QUEIROZ, C.; TRAVASSOS, A.,G.; STUDART, E.; FILHO, J., B., A.; SARNO, C., K.; PINHEIRO, C., C. Prevalence of Human Papilloma Virus in HIV-Positive and HIV-negative Patients in the State of Bahia. A Pilot Study. **Br J Infec Dis**. 2004;8(5):356-62.

SUN, X., W.; ELLERBLOCK, T.,V.; LUNGUN, O.; CHIASSON, M., A.; BUSH, T., J.; WRIGHT, T., C. Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. **Obstet Gynecol**. 2005;5:680-6.

MINKOFF, H.; FELDMAN, J.; DEHOVITZ, J.; LANDESMAN, S.; BURK, R. A. longitudinal study of human papillomavirus carriage in human immunodeficiency virus-infected and human immunodeficiency virus-uninfected women. **Am J Obstet Gynecol**. 1998;178(5):982-6.

PALEFSKY, J., M. Cervical human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia in woman positive for human immunodeficiency virus in the era of highly active antirretroviral therapy. **Curr Op Oncol**. 2003;15:382-8. 13.

PALEFSKY, J., M. HPV infection and HPV-associated neoplasia in immunocompromised women. **Int J Gynaecol Obstet**. 2006;94(1):6-64.

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecol Oncol**. 2008;110:4-7.

EDISON, N.; F., JULIANA, K.; LAUREANO; CRISTIANE, S.; MARISTELA, O.; CAMPOS; MARIA, E., M. Infecção pelo papilomavírus Humano (Hpv) em mulheres Hiv-positivo de Florianópolis, Santa Catarina. **DST - J bras Doenças Sex Transm** 2011; 23(4): 205-209 - ISSN: 0103-4065 - ISSN on-line: 2177-8264.

SANDRA, M., N., A., C.; IRIS, L., P., L., O.; IOVANNI, T., S. Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde. 2015.

ZIMMERMMANN, J., B.; MELO,V., H.; CASTRO, L., P., F.; ALVES, M., J., M.; ZIMMERMMANN, S., G.; CASTILLO, D., M. Associação entre a contagem de linfócitos T CD4+ e a gravidade da neoplasia intra-epitelial cervical diagnosticada pela histopatologia em mulheres infectadas pelo HIV. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2006;28(6):345-51.

CAMPOS, R., R.; MELO, V., H.; CASTILLO, D., M.; NOGUEIRA, C., P., F. Prevalência do papilomavírus humano e seus genótipos em mulheres portadoras e não-portadoras do vírus da imunodeficiência humana. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2005;27(5):248-56.

ARAÚJO, A., C., L.; MELO, V., H.; CASTRO, L., P., F.; GUIMARÃES, M., D., C.; ALEIXO, A., W.; SILVA, M., L. Associação entre a carga viral e os linfócitos T CD4+ com as lesões intra-epiteliais do colo uterino em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2005;27(3):106-11.

ARAÚJO, A., C, CARVALHO, N., O, TEIXEIRA, N., C, et al, Incidence of cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of HIV-infected women. **Int J Gynaecol Obstet** 2012; 117:211-6.

CARMO, E., F., S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. **Rev Saúde Biol.** 2007;2(1)29-31.

CHRISTIANE, M., C.; VICTOR, H., M.; DORA. M., D., C.; NARA, O., C. Coinfecção HIV-HPV: prevalência e multiplicidade de genótipos do HPV no colo uterino. **Femina**, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde. Rio de Janeiro: Inca, 2006.

19

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Política nacional de promoção da saúde. 3. ed. **Brasília**, 2010b

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer control: knowledge into action: WHO guide for efective pogrammes. Switzerland: WHO, 2007. _____. International agency for research on cancer. Globocan 2008. **Lyon**: WHO, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de atenção básica: Controle dos cânceres do colo do útero e de mama. 2ªed. **Editora MS**. Brasília, 2013.

MULLER, D., K.; DIAS, D., C., J., S.; LUS, A., M., H.; OLINTO, M., T., A. Cobertura do exame citopatológico do colo do útero na cidade de São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno Saúde Pública**. 2008.

NADAL, L., R., M.; NADAL, S., R. Indicações da vacina contra o Papilomavirus Humano. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. 2008

MANOS, M. M.; TING, Y.; WRIGHT, D. K.; LEWIS, A. J. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p. 209-214, 1989.

CERQUEIRA, D. M.; RAIOL, T.; VÉRAS, N. M. C.; GAL MILANEZI, N.; AMARAL, F. A.; MACEDO, B. M.; MARTINS, C. R. F. New variants of human papillomavirus type 18 identified in central brazil. **Virus Genes**, v. 37, p. 282-287, 2008.

LEPIQUE, A., P.; RABACHINI, T.; VILLA, L., L. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer? a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2009.

MELO, A. U. C. de, et al. Papilomavírus humano como fator de risco para o carcinoma bucal e de orofaringe. **Revista Brasileira Cirurgia de Cabeça Pescoço**. 2012.

TUCUNDUVA, L., T., C., M.; SÁ, V., H., L., C.; KOSHIMURA, E., T.; PRUDENTE, F., V., B.; SANTOS, A., F.; SAMANO, E., S., T., et al. Estudo da atitude e do conhecimento dos médicos não oncologistas em relação às medidas de prevenção e rastreamento do câncer. **Revista Associação Médica Brasileira**. 2004

COSSART, Y., E.; THOMPSON, C., ROSE, B., MINDEL, A. Verrugas genitais, infecção pelo Papilomavirus Humano. **Londres**. 1994.

GIL, A., O. Análise Crítica da Associação do papilomavírus humano (HPV) e da proteína p53 nenhum caso de câncer de pênis. São Paulo, 1998. (Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

LUCIANI, S.; ANDRUS, J., K. A Pan American Health Organization strategy for cervical cancer prevention and control in Latin America and the Caribbean. **Reproductive Health Matters**. 2008

OTTO, S., E. Neoplasias malignas ginecológicas. **Oncologia**. 2002

DE RODA HUSMAN, A., M. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virol** 1995;76:1057-62.

FAVRE, M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. **Journal of virology**. 1975;15(5):1239-47.

BURD, E., M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev** 2003;16:1–17.

GONZÁLEZ, M. A. Molecular biology of cervical cancer Clinical and Translational **Oncology**, Madrid, v. 9, n. 6, p. 347-354, 2007.

SAPP, M. et al. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. **Journal of General Virology**, Mainz, v. 76, n. 9, p. 2407–2412, 1995.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, Cambridge, v. 109, n. 2, p. S15-21, 2008.

SYRJÄNEM, S. M.; SYRJÄNEM, K.J. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. **Annals of Internal Medicine**, Turku, v. 31, n. 3, p. 175– 187, 1999.

MARKOWITZ, L.E. et al. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recommendations and Reports, **Atlanta**, v. 56, n. RR-2, p. 1-24, 2007.

HORVATH, C.A.J. et al. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology Journal**, Antuérpia, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2010.

KANESHIMA, E.N. et al. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá . *Acta Scientiarum. Health Science*, Maringá, v. 23, 2001.

WALBOOMERS. J.M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, Amsterdã, vol. 189, n. 1, p. 12—9, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1288:F55-78

BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *The Lancet Oncology*, Lyon, v. 10, p. 321-322, 2009.

DE VILLIERS, E., M.; FAUQUET, C.; BROKER, T., R.; BERNARD, H., U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology** 2004; 324:17-27.

BRANDÃO, V., C., R., A., B.; LACERDA, H., R.; LUCENA-SILVA-SILVA, N, et al. Frequency and types of human papillomavirus among pregnant and non-pregnant women with human immunodeficiency virus infection in Recife determined by genotyping. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2009; 104:755-763.

BOSCH, F.X. et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. **Vaccine**, Barcelona, v. 26, n. 10, p. K1–K16, 2008.

MUNOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, Lyons, v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003.

BAKER, C.C. et al. P., M. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **Journal of Virology**, Maryland, v. 61, n. 4, p. 962-971, 1987.

ARENDS, M., J.; BUCKLEY, C.H.; WELLS, M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. **Journal of Clinical Pathology**, Edinburgo, v. 51, n. 2, p. 96- 103, 1998.

THORLAND, E.C. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Research*, Rochester, v. 60, n. 21, p. 5916-5921, 2000.

TROTTIER, H. et al. Persistence of an Incident Human Papillomavirus Infection and Timing of Cervical Lesions in Previously Unexposed Young Women .**Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Quebec, v. 18, n. 3, p. 854-862, 2009.

KAHESA, C. et al. Association between invasive cancer of the cervix and HIV-1 infection in Tanzania: the need for dual screening. **BMC Public Health**, Dar es Salaam, v. 8, n. 262, p. 1-8, 2008.

KALANTRI, M. et al. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. **Diagnostic Molecular Pathology**. , Huddinge , v. 10, n. 1, p. 46-54, 2001.

HUDELIST, G. et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. **Gynecologic Oncology**, Viena, v. 92, n. 3, p.873-880, 2004.

WENTZENSEN, N.; VINOKUROVA, S.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. **Cancer Research**, Heidelberg, vol. 64, n. 11, p. 3878-3884, 2004.

COUTURIER, J. et al. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. **Journal of Virology**, v. 65, n. 8, p. 4534-4538, 1991.

ROSTY, C., P., M. et al. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. **Oncogene**, Paris, v. 25, n. 44, p. 5985-5993, 2006.

MOSCICKI, A.B. et al. Chapter 5:Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, São Francisco, v. 24, n. 3, p. S42–51, 2006.

PAAVONEN, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. **International Journal of Infectious Diseases**, Helsinque, v. 11, Suppl 2, p. S3-9, 2007.

SPIITZER, M. Cervical screening adjuncts: recent advances. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, Nova York, v. 179, n. 2, p. 544–556, 1998.

HOLOWATY, P. et al. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. **Journal of the National Cancer Institute**, Ontario, v. 91, n. 3, p. 252–258 , 1999.

SAHASRABUDDHE, V., V. et al. Prevalence and Predictors of Colposcopichistopathologically Confirmed Cervical Intraepithelial Neoplasia in HIV-Infected Women in India . **Plos One**, Nashville, v. 5, n. 1, p. e82010, 2010.

NG`ANDWE , C. et al. The distribution of sexually-transmitted human papillomaviruses in HIV positive and negative patients in Zambia,Africa. **BMC Infectious Diseases**, Lincoln, v. 7, n. 77, p. 1-10, 2007.

PAAVONEN, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. **International Journal of Infectious Diseases**, Helsinque, v. 11, Suppl 2, p. S3-9, 2007.

PARKIN, D.M. et al. Global cancer statistics, 2002. *A Cancer Journal for Clinicians*, Lyon, v. 55, n. 2, p. 74–108, 2005.

RAHMAN, M. et al. High prevalence of intermediate-risk human papillomavirus infection in uterine cervixes of Kenyan women infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Medical Virology*, Kahoku, v. 83, n. 11, p. 1988-1996, 2011.

MINKOFF , H. et al. The effect of highly active antiretroviral therapy on cervical cytologic changes associated with oncogenic HPV among HIV-infected women. *AIDS*, Nova York, v. 15, n. 16, p. 2157–2164, 2001.

LUQUE, A.E. et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and related abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-infected women in Rochester, New York. *The Journal of Infectious Diseases*, Rochester, v. 194, n. 4, p. 428-434. 2006.

GARBUGLIA, A.R. et al. Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy. *Journal of Clinical Virology*, Roma, v. 54, n. 2, p.141-146, 2012.

MEYS, R.; GOTCH, F.M.; BUNKER, C.B. Human papillomavirus in the era of highly active antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus: an immune reconstitution-associated disease? *British Journal of Dermatology*, Londres, v. 162, n. 1, p. 6-11, 2010.

